

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



**Lenka Eichlerová**

Molekulární fyziologie adenosinových receptorů

Molecular physiology of adenosine receptors

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2013

**Poděkování:**

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za jeho ochotu a cenné rady při psaní této práce.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.04.2013

Podpis

## Abstrakt

Adenosin zprostředkovává své fyziologické signální funkce přes interakci se čtyřmi receptorovými podtypy. Jedná se o adenosinové receptory spřažené s G proteiny, které se rozlišují na A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub> receptory. Jsou rozšířeny téměř ve všech tkáních lidského těla, a proto mohou ovlivňovat mnoho fyziologických procesů a dysfunkce adenosinového systému se může mít různé patologické důsledky. Aktivita adenosinových receptorů je inhibována methylxantiny. Typickým neselektivním antagonistou je kofein, který ve spojitosti s adenosinovými receptory působí zejména na spánkový cyklus. Velký pokrok ve studiu struktury adenosinových receptorů nastal po vytvoření krystalografického modelu A<sub>2A</sub> receptoru ve vazbě s antagonistou ZM241385 neboli super-koфеinem. Znalost struktury těchto receptorů, stejně jako molekulárních mechanismů jejich regulace a interakcí, je základním bodem při vývoji nových léčiv, které budou vysoce účinné a selektivní k jednotlivým receptorovým podtypům.

**Klíčová slova:** Adenosinový receptor, G protein, signalizace, struktura, transmembránový protein

## Abstract

Adenosine mediates its physiological signaling functions through the interaction with four receptor subtypes. The adenosine receptors belong to the superfamily of G protein-coupled receptors and are named A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub> receptors. Since they are widespread throughout the body, they are involved in many physiological processes and dysfunction of the adenosine system may have serious pathological consequences. Activity of adenosine receptors is inhibited by methylxanthines. Caffeine is a typical non-selective antagonist of the receptors, which is known to affect the sleep cycle. A great progress occurred in understanding the structure of adenosine receptors after the crystallographic model was solved for A<sub>2A</sub> receptor in complex with the antagonist ZM241385, which is referred to as super-caffeine. Understanding the receptor structure as well as the molecular mechanisms underlying the regulation of their function and interactions represent a starting point to the development of new drugs, which are going to be highly efficient and selective for each adenosine receptor subtype.

**Key words:** Adenosine receptor, G protein, signaling, structure, transmembrane protein

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	3
<b>Úvod</b> .....	5
<b>Struktura</b> .....	6
Primární sekvence a kovalentní modifikace .....	7
Oligomerizace receptorů .....	8
A <sub>2A</sub> receptor – modelový příklad .....	8
<b>Ligandy</b> .....	10
Selektivní agonisté a antagonisté .....	10
A <sub>1</sub> selektivní agonisté a antagonisté .....	12
A <sub>2A</sub> selektivní agonisté a antagonisté .....	13
A <sub>2B</sub> selektivní agonisté a antagonisté .....	15
A <sub>3</sub> selektivní agonisté a antagonisté .....	15
Neselektivní agonisté a antagonisté .....	16
<b>Alosterické modulace</b> .....	17
A <sub>1</sub> receptor .....	17
A <sub>2A</sub> a A <sub>2B</sub> receptor .....	17
A <sub>3</sub> receptor .....	18
<b>Signalizace</b> .....	18
Sekundární posli a signály .....	19
Desenzitizace a internalizace .....	20
Interakce .....	21
<b>Patologie</b> .....	22
Neurologická onemocnění .....	23
Psychiatrická onemocnění .....	24
Rakovina .....	25
<b>Závěr</b> .....	26
<b>Seznam použité literatury</b> .....	27

## Úvod

Adenosin je purinový nukleosid přítomný ve všech tkáních lidského těla. Hraje významnou roli v mnoha fyziologických procesech a jeho koncentrace v buňkách je přísně regulována. Adenosin má velký význam v kardioprotekci. Byla prokázána jeho účinnost v prevenci ischemie nebo reperfučního poškození. Kromě buněk kardiovaskulárního systému má důležitou funkci v nervové tkáni, kde vykazuje neuromodulační účinky. Ovlivňuje neuronální excitabilitu, uvolňování některých neurotransmiterů a synaptickou plasticitu.

Signalizaci extracelulárního adenosinu zprostředkovávají membránově vázané adenosinové receptory. Řadí se mezi receptory spřažené s G proteiny třídy A neboli rodopsin-like GPCRs. Doposud byly identifikovány 4 podtypy adenosinových receptorů:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  a  $A_3$ . Aktivace  $A_1$  a  $A_3$  receptorů inhibuje aktivitu adenylátcyklázy přes inhibiční  $G_i$  proteiny, což vede ke snížení produkce cAMP. Naopak  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  receptory způsobují stimulaci tohoto enzymu a zvyšují produkci cAMP prostřednictvím  $G_s$  nebo  $G_o$  zprostředkované odpovědi. Tyto páry také vykazují vyšší sekvenční identitu (lidské  $A_1$  a  $A_3$  kolem 49%,  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  59%).

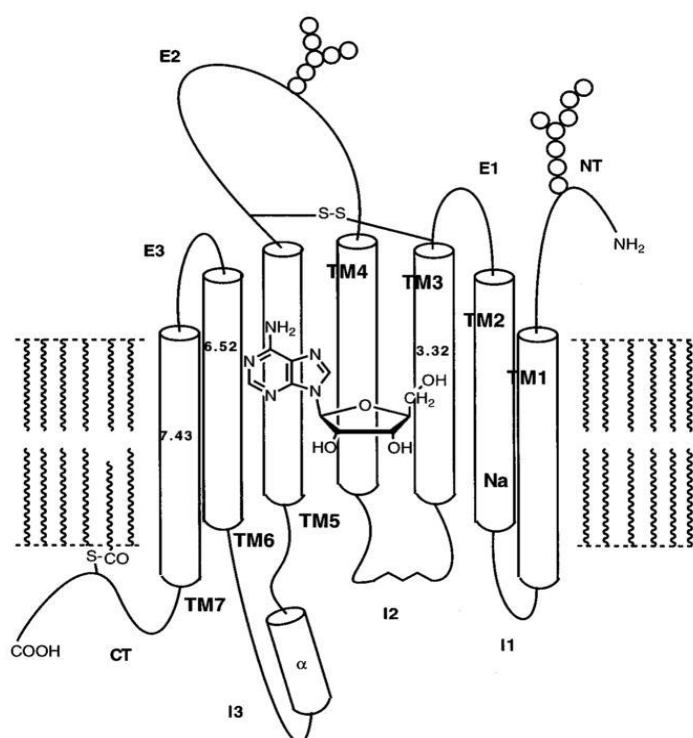
Adenosinové  $A_1$  a  $A_{2A}$  receptory regulují uvolňování neurotransmiterů a depolarizaci membrán nervových buněk v centrální i periferní nervové soustavě. Abnormální funkce těchto receptorů je spojována s onemocněním jako Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba a roztroušená skleróza. V oblasti zájmu je proto výzkum těchto receptorů a následné uplatnění jako terapeutického cíle k léčení těchto chorob, stejně jako jejich vliv na nespavost a drogovou závislost.

Aktivita adenosinových receptorů je inhibována methylxantiny, přičemž mezi nejčastější patří kofein nebo teofylin. V novějších studiích bývá proto uváděno, že konzumenti kávy a čaje mají menší riziko zisku Parkinsonovy choroby. Kromě zkoumání antagonistů, jako potenciálních terapeutických agens, se do popředí zájmu dostávají také alosterické modulátory. Spekuluje se nad využitím alosterických enhancerů při kardiovaskulárních problémech (arytmie, ischemie), diabetu, rakovině, autoimunitních chorobách nebo chronických zánětlivých reakcích.

Základem pochopení účinků a signalizace adenosinových receptorů je podrobná znalost jejich struktury a interakcí. Cílem této bakalářské práce je vypracovat souhrn dosavadních poznatků o molekulární struktuře a fyziologii těchto receptorů, jejich interakcích s ligandy a efektorovými molekulami a poukázat na možnosti dalších výzkumů terapeutického užití těchto receptorů.

## Struktura

Adenosinové receptory patří mezi GPCRs třídy A (rodopsin-like). GPCRs je jedna z největších rodin proteinů signální transdukce a bývá cílem až 40% všech momentálně existujících léčiv. Všechny tyto receptory jsou tvořeny 7 transmembránovými  $\alpha$ -helixy (1-7TM) následovanými jedním krátkým s membránou asociovaným helixem (helix 8). Na extracelulární straně je amino N-konec a 3 extracelulární smyčky (ECL1-3), kdežto na cytosolické straně nalezneme karboxylový C-konec s 3 intracelulárními smyčkami (ICL1-3). Ačkoliv primární sekvence členů GPCR třídy A obsahuje pouze několik vysoce konzervovaných zbytků, obecná struktura 7 transmembránových domén je velmi podobná mezi všemi receptory této skupiny (Piirainen *et al.*, 2011).



Obr. 1: Schéma obecné topologie GPCRs s navázaným adenosinem. NT = N-konec; CT = C-konec; Ix = intracelulární smyčka; Ex = extracelulární smyčka. Znázornění lokalizace zbytků v TM3, TM5 a TM7, které jsou důležité pro vázání ligandů. Glykosylace na E2 a NT segmentu  $A_{2A}$  receptoru. Palmitoylační místa na CT segmentu  $A_1$  a  $A_3$  receptoru. I3 tvořící přímý kontakt s G-proteiny obsahuje  $\alpha$ -helikální oblast (Jiang *et al.*, 1997).

Transmembránové domény téže receptorové rodiny vázající stejný endogenní ligand bývají vysoce podobné, na rozdíl od oblastí smyček, které se mohou velmi lišit v sekvenci i délce. Role, jakou tyto smyčky zaujímají v aktivačních mechanismech, však zůstává neobjasněna. V posledních letech,

díky vytvoření několika krystalových modelů, došlo k většímu porozumění jednotlivých struktur. Ukazuje se, že nejméně konzervované jsou extracelulární domény, což naznačuje, že extracelulární smyčky by mohly být unikátní pro každý jednotlivý receptor (Peeters *et al.*, 2012).

Nejvíce konzervované zbytky a sekvenční motivy mezi GPCRs třídy A tvoří mikrodomény (Piirainen *et al.*, 2011), mezi které patří:

- a) Ballesteros-Weinstein residues (nejkonzervovanější helikální zbytky)
- b) E/DRY motiv
- c) rotamer toggle residues
- d) NPXXYF motiv (vazba vodíkovými můstky k molekulám vody)

Motiv E/DRY (glutamová/asparagová kyselina-arginin-tyrosin) je pro svoji schopnost regulovat konformační stavy GPCRs důkladněji studován v souvislosti s objasněním aktivačních mechanismů G proteinů. Glutamová nebo asparagová kyselina udržují receptor v základním stavu, což bylo odvozeno od zjištění, že jejich mutace většinou indukují konstitutivní aktivitu. Některé GPCRs třídy A ovšem zůstávají vůči stejným mutacím rezistentní a tudíž se předpokládá alternativní role těchto aminokyselinových zbytků v E/DRY motivu. Byly navrženy 2 receptorové fenotypy nezávislé na typu G proteinu. U fenotypu 1 mutace E/DRY motivu kromě indukce konstitutivní aktivity zvyšují afinitu vazby agonistů a zachovávají G protein zprostředkovanou odpověď. Naopak u receptorů fenotypu 2 je E/DRY motiv přímo zapojen v řízení konformačních změn receptoru a schopnosti interagovat s G proteiny. Mutace aminokyselinových zbytků tedy neindukují konstitutivní aktivitu, ale konkrétně mutace argininu vždy snižují vazebnou afinitu agonistů (Rovati *et al.*, 2007).

### **Primární sekvence a kovalentní modifikace**

Celkově je u lidských adenosinových receptorů sekvenční podobnost relativně vysoká. A<sub>2A</sub> receptor má vyšší sekvenční identitu s A<sub>2B</sub> receptorem (46%) než s A<sub>1</sub> (37%) nebo A<sub>3</sub> receptorem (31%). Všechny podtypy mají glykosylační místa na N-konci. Glykosylace neovlivňuje schopnost vazby ligandů, předpokládá se však, že má vliv na zacílení receptorů do plazmatické membrány. Na všech podtypech receptorů se dále vyskytuje několik fosforylačních míst v C-terminálních a cytosolických doménách (Piirainen *et al.*, 2011). A<sub>1</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub> receptory mají navíc palmitoylační místa na konci helixu 8. Odstranění těchto míst mutagenézí nemá žádný efekt na vazbu G proteinu, případně na interakci s dalšími regulačními molekulami. U některých receptorů však dojde v důsledku mutace palmitoylačního místa ke zrychlení jejich degradace (Gao *et al.*, 1999).

## Oligomerizace receptorů

GPCRs mohou tvořit oligomerické struktury jako homodimery, heterodimery a multimery. Receptory  $A_1$  a  $A_{2A}$  se také mohou účastnit různých interakcí s dalšími GPCRs. Velmi studovaná je dimerizace adenosinového  $A_1$  a dopaminového  $D_1$  receptoru. Agonisté  $A_1$  receptoru inhibují vazebnou schopnost receptoru dopaminového. Existuje více příkladů podobných synergistických vztahů, které jsou částečně způsobeny zkříženou signalizací druhých posílů (Canals *et al.*, 2004).

Homodimerizace nebyla zpočátku studována příliš intenzivně. Ukázalo se však, že funkční jednotky  $A_{2A}$  receptoru na buněčném povrchu tvoří homodimery, nikoliv monomery. Ačkoliv vazba agonistů a aktivace receptorů vede ke tvorbě receptorových shluků, nijak neovlivňuje množství  $A_{2A}$  homodimerů. Navíc biotinylace proteinů buněčného povrchu odhalila, že více než 90% povrchových receptorů je v dimerické formě. Na tvorbu homodimerů nemá žádný vliv C-terminální doména, což je značný rozdíl oproti tvorbě heteromerů (Canals *et al.*, 2004).

I přes množství studií zabývajících se homodimerizací  $A_1$  a  $A_{2A}$  receptoru nebo počítačovým analýzám dimerizace  $A_3$  receptoru, zůstávají detaily dimerizačních míst nejasné.

## $A_{2A}$ receptor – modelový příklad

Nejlépe prostudovaným adenosinovým receptorem je  $A_{2A}$  receptor. Byl vytvořen krystalografický model s rozlišením do 2,6 Å v komplexu s antagonistou ZM241385, který se díky svému silnému antagonistickému účinku na adenosinové receptory označuje jako super-koфеin. Kvůli existenci různých konformací a neuspořádaných oblastí v GPCRs je obtížné tyto receptory krystalizovat. Publikovaná krystalická struktura  $A_{2A}$  receptoru není struktura nativního proteinu, ale uměle vytvořeného konstruktu. Tento umělý receptor byl modifikován na N-konci přidáním signální sekvence (hemaglutinin) a detekční značky (FLAG-M2) (Piirainen *et al.*, 2011).

Hlavním problémem při krystalizaci GPCRs je množství jejich termodynamických konformací a tedy strukturální flexibilita. Po působení detergentu a extrakci z lipidových membrán jsou receptory termálně nestabilní. Pro obejití těchto potíží byla při krystalizaci  $A_{2A}$  receptoru použita fúzní strategie T4L (T4-lysozym). Přitom byla nahrazena většina třetí cytosolické smyčky lysozymem z T4 bakteriofága a C-terminální konec byl odstraněn, což napomohlo ke zvýšení pravděpodobnosti krystalizace receptoru (Jaakola *et al.*, 2008).

Extracelulární smyčky  $A_{2A}$  receptoru tvoří nálevkovitou doménu, která umožňuje otevřený přístup do ligand-vazebné dutiny. Struktura extracelulární části receptoru je určena zejména druhou extracelulární smyčkou (ECL2), která se významně odlišuje od smyčky  $\beta$ -adrenoreceptorů a rodopsinu. ECL2  $A_{2A}$  receptoru postrádá klasickou sekundární strukturu  $\alpha$ -helixů a  $\beta$ -listů. Namísto toho je tvořena náhodnými spirálami, spojenými třemi disulfidickými vazbami s ECL1. V ECL3 se



vyskytuje ještě čtvrtá disulfidická vazba, která vyváží zlom ve smyčce a orientuje histidin na povrch ligand-vazebného místa. Tato rozsáhlá disulfidická vazebná síť vytváří otevřenou strukturu, vystavuje ligand-vazebné místo do roztoku a pravděpodobně tak umožňuje volný přístup malým molekulám (Jaakola et al., 2008).

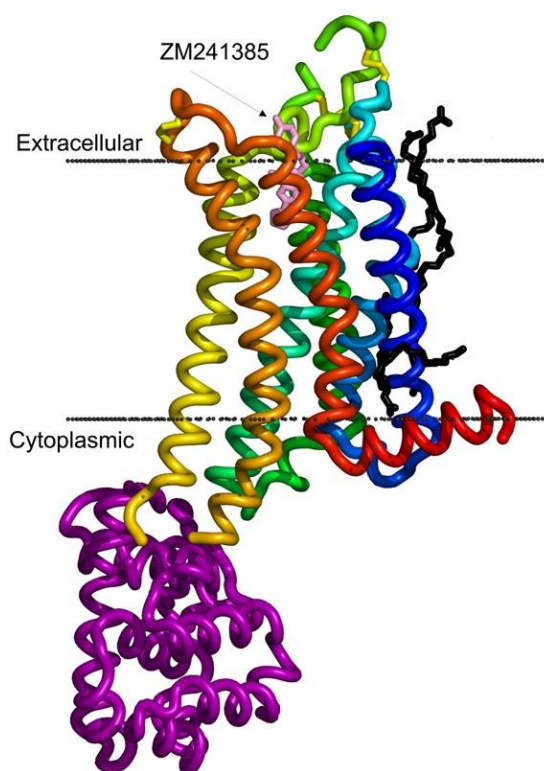
Struktura ligand-vazebného místa GPCRs bývá popisována podle rodin adrenergních, dopaminových nebo serotoninových receptorů. Ligandy těchto receptorů jsou při fyziologickém pH kladně nabitě aminy interagující se záporně nabitým aspartátovým zbytkem na helixu III. Ovšem u  $A_{2A}$  receptoru antagonist ZM241385 zaujímá výrazně odlišnou pozici v transmembránové oblasti tím, že jeho orientace je téměř kolmá k rovině membrány. Jeho bicyklické triazolo-triazinové (BCT) jádro je ukotveno interakcemi s fenylalaninem, alifatickou hydrofobní interakcí s izoleucinem a vodíkovým můstkem s asparaginem (Jaakola et al., 2008). Vazebnými a mutagenními studiemi bylo stanoveno několik klíčových interakcí, které se podílí na vazbě ligandu. Podstatné se ukazuje BCT jádro a heterocyklická kostra, které se obecně vyskytují u receptorových agonistů i antagonistů a interagují se stejnými skupinami nebo zbytky na receptoru (Piirainen et al., 2011). Avšak podle struktury ligand-vazebného místa  $A_{2A}$  receptoru se předpokládá, že neexistuje žádná obecně konzervovaná receptor-vazebná kapsa, kde je selektivita dosažena na základě různých aminokyselinových řetězců. Spíše by se jednotlivé vazebné kapsy mohly lišit umístěním a orientací na receptoru a nabízet tak více možností pro selektivitu ligandů (Jaakola et al., 2008).

Intracelulární domény zajišťující vazbu s G proteiny jsou narušeny v krystalografické struktuře  $A_{2A}$  receptoru inzercí T4-lysozymu. Nicméně i přes tyto omezené možnosti zde byl identifikován významný E/DRY motiv na ICL2. Dalším zajímavým znakem je prodloužený helix 6. Toto prodloužení je zřetelné jak u  $A_{2A}$  receptoru, tak u rodopsinu. Mohlo by se ale jednat o artefakt způsobený inzercí T4 lysozymu (Piirainen et al., 2011).

Studium struktury C-konce je obtížné, protože při jeho odstranění dochází k výraznému zlepšení receptorových vlastností v micelách a tedy jeho odstranění je podmínkou krystalizace. GPCRs signalizace je definována prostřednictvím interakce receptorů s heterotrimerními G proteiny. Kromě interakce s příslušnými G proteiny má C-konec GPCRs důležitou roli v desenzitizaci receptorů zprostředkovanou kinázami receptorů spřažených s G proteiny - GRKs (G protein-coupled receptor kinases) a arrestiny. Nicméně karboxylový konec může vázat mnoho dalších proteinů, které se hromadně označují jako proteiny interagující s GPCRs - GIPs (GPCRs-interacting proteins). Jedná se o výrazně diverzifikovanou skupinu zahrnující rozpustné signální molekuly (např. kalmodulin), periferní membránové proteiny nebo transmembránové proteiny (Keuerleber et al., 2011).

Na rozdíl od ostatních třech adenosinových receptorů má  $A_{2A}$  receptor neobvykle dlouhý C-konec. Délka 122 aminokyselin je výrazně odlišná od délky 40, 38 a 34 aminokyselin v  $A_{2B}$ ,  $A_1$  a  $A_3$  receptorech. Právě jeho délka a flexibilita (díky tomu, že není omezován lipidickou kotvou) je zřejmě

zodpovědná za schopnost vazby mnoha odlišných proteinů. Prozatím bylo identifikováno minimálně 6 GIPs a další neustále přibývají. Příkladem je ubiquitin-specifická proteáza 4 (USP4), výměnný faktor guaninových nukleotidů a  $\alpha$ -aktinin. Ačkoliv prodloužená konformace C-konce poskytuje dostatek místa pro interakce, velikost jednotlivých vazebných partnerů znemožňuje jejich současnou vazbu. Navíc se některá vazebná místa pro odlišné proteiny překrývají, z čehož bylo usouzeno, že tyto individuální interakce jsou pouze přechodné (Keuerleber et al., 2011).



Obr.2: 3D struktura komplexu  $A_{2A}$  receptor:antagonista ZM241385. N-konec: modrý; C-konec: červený; T4-lyzozym: fialový; ZM241385: růžový, lipidy: černé (Piirainen et al., 2011)

## Ligandy

### Selektivní agonisté a antagonisté

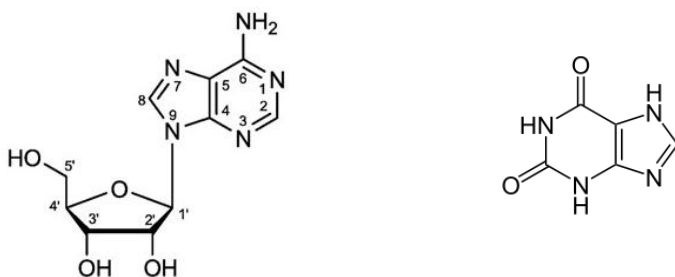
Aktivace adenosinových receptorů bývá cytoprotektivní v mnoha orgánech a tkáních. Množství extracelulárního adenosinu se může zvyšovat v odpovědi na stres vyvolaný hypoxií a následná aktivace adenosinových receptorů umožňuje adaptaci na stres. Koncentrace extracelulárního adenosinu se mohou zvýšit důsledkem rozpadu extracelulárního ATP nebo z intracelulárních zdrojů, což vede k aktivaci receptorů v blízkém okolí. Tyto protektivní odpovědi mohou mít formu snížení energetické poptávky, zvýšení energetické dodávky (vazodilatace, angiogeneze), ischemický preconditioning (v srdci nebo mozku), inhibici nebo uvolnění excitotoxických neurotransmiterů, potlačení cytokin-indukované apoptózy nebo snížení zánětlivé odpovědi (Fredholm et al., 2011).

Kvůli potenciálně významným terapeutickým efektům je vyvíjena snaha o přípravu selektivních ligandů u všech čtyř podtypů adenosinových receptorů. Nejnovější třídou selektivních ligandů jsou agonisté  $A_{2B}$  receptoru. Při charakterizaci nových ligandů je třeba dbát zejména na druhovou závislost afinity ligandu k receptorům. Stejný ligand (hlavně antagonisté  $A_3$  receptoru) může být selektivní pro daný podtyp v jednom druhu (např. člověk) a ztratit nebo zvrátit selektivitu u druhu jiného (např. potkan). Kromě selektivity je nutné při designování ligandů brát v úvahu přirozenou dostupnost a metabolickou stabilitu (Müller & Jacobson, 2011).

Jako terapeutické látky jsou ve vývoji syntetické agonisté adenosinových receptorů. Poločas života adenosinu je velmi krátký (cca 1 s) kvůli rychlé enzymatické konverzi na inosin nebo fosforylaci na 5'-AMP. Analoga adenosinu by se těmto procesům mohla vyhnout a zvýšit tak svůj poločas života. Adenosin se sám o sobě používá k léčbě tachykardie a v radionukleotidovém zobrazování. Doposud se klinicky používá pouze jeden syntetický adenosinový agonista (regadenoson, agosinta  $A_{2A}$  receptoru), ale spíše pro diagnostické než terapeutické účely. Velkým problémem je desenzitizace receptoru po vazbě agonisty a jeho následná downregulace. Odpovědi adenosinových receptorů se mohou takto snižovat velmi rychle (Müller & Jacobson, 2011).

Také syntetické antagonisté adenosinu jsou ve výzkumu pro terapeutické využití. Analogové xantiny zvyšující selektivitu jednotlivých podtypů adenosinových receptorů oproti přirozeně se vyskytujícím alkylxantinům bývají hydrofobní a málo biologicky dostupní (Müller & Stein, 1996). Při vývoji léčiv se nyní začaly uplatňovat radioligandy a nejnověji fluorescenční ligandy, které dávají výhodu práci bez použití radioizotopů.

Je známo, že adenosinové deriváty fungují jako agonisté adenosinových receptorů. Proto téměř všichni známí agonisté adenosinových receptorů jsou deriváty purinových nukleosidů, adenosinu nebo xantosinu. Z tohoto důvodu je zřejmé, že strukturálně odlišné chemické sloučeniny budou typicky představovat antagonisty (Müller & Jacobson, 2011).



Obr. 3: Adenosin (vlevo) a xantin (vpravo).

Většina receptorových agonistů je vytvořena modifikací adenosinu substitucemi na  $N^6$ , C2 a C8 pozicích adeninové báze a C5' modifikace ribóзовé části (Fredholm et al., 2011).

## A<sub>1</sub> SELEKTIVNÍ AGONISTÉ A ANTAGONISTÉ

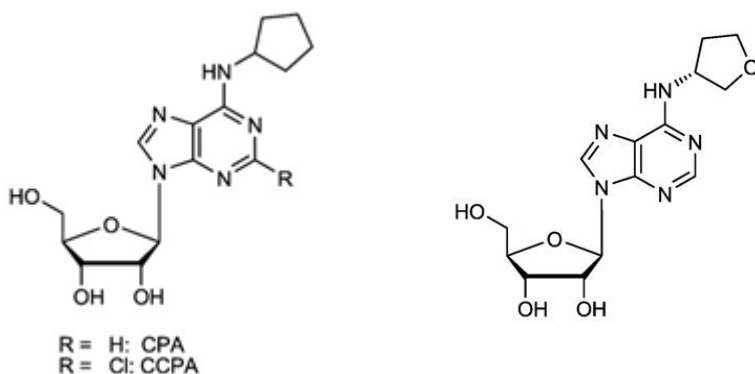
Agonisté A<sub>1</sub> adenosinového receptoru mimikují biologickou aktivitu samotného adenosinu a mohly by tak nabízet několik terapeutických využití. Prozatím jsou studovány z hlediska svých analgetických, antiepileptických, neuroprotektivních, antiarytmických a anti-lipolytických vlastností.

Zkoumají se také parciální agonisté. Oproti klasickým agonistům mají nízkou účinnost a ani při obsazení všech dostupných receptorů nevyvolávají maximální odpověď. Parciální agonisté by mohli mít větší terapeutické využití než normální agonisté, protože zde nedochází k velkým hemodynamickým disturbancím jako u klasických agonistů a mohli by vyvolávat nižší receptorovou desenzitizaci a downregulaci (Schenone *et al.*, 2010).

Z hlediska chemické struktury je většina agonistů adenosinových receptorů strukturně příbuzná adenosinu. Obsahují purinovou a ribózovou část, výjimkou je 3,5-dikyano-4-phenyl-6-aminopyridinová rodina. Velký důraz je kladen na vztah struktura-aktivita adenosinových derivátů. Obecně substituce na N<sup>6</sup>-pozici adenosinu širokou škálou alkylových, cykloalkylových a arylalkylových skupin zvyšuje selektivitu pro A<sub>1</sub> adenosinový receptor. Navíc se prokázalo, že vodíkový atom na N<sup>6</sup>-pozici je důležitý pro aktivitu. N-N disubstituované adenosinové deriváty vykazovaly výrazné snížení aktivity. Z toho je pravděpodobné, že vodíkový atom na N<sup>6</sup>-pozici adenosinu by se mohl podílet na vodíkové vazbě s receptorem (Schenone *et al.*, 2010).

Substituce 5'-OH skupiny ribózové části je také velmi dobře tolerovaná a vede ke zvýšení selektivity, zatímco 2' nebo 3' skupiny jsou méně preferované s ohledem na aktivitu. Změna 5' skupiny může vést ke zvýšení životnosti agonisty v těle, protože snižuje afinitu adenosin deaminázy, která *in vivo* velmi rychle degraduje adenosin (Hutchinson & Scammells, 2004).

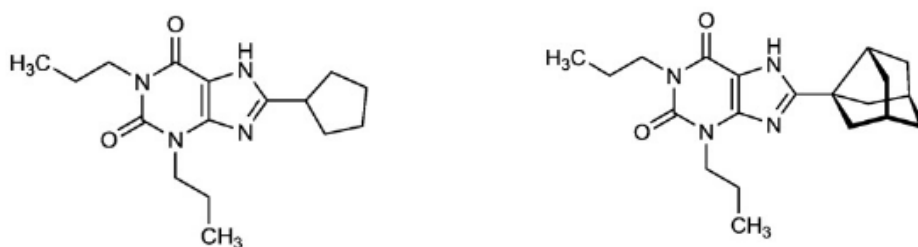
N<sup>6</sup>-cykloalkylové substituce se ukázaly jako nejúspěšnější v dosažení selektivity pro A<sub>1</sub> adenosinový receptor. N<sup>6</sup>-cyklopentyladenosin (CPA) a jeho 2-chloro- analog jsou nejvíce užívané selektivní farmakologické látky (Müller & Jacobson, 2011). Nejzajímavějším N<sup>6</sup>-substituovaným derivátem je tecadenoson, označovaný také jako CVT-510 (od CV Therapeutics), který jako jeden z mála adenosinových agonistů dosáhl klinického testování.



Obr. 4: Agonisté A<sub>1</sub> receptoru; N<sup>6</sup>-cyklopentyladenosin (vlevo) a tecadenoson (vpravo)

U  $A_1$  antagonistů se jako nejlépe selektivní a vysoce afinitní prokázaly modifikované xantiny na 8-pozici jádra pomocí arylových nebo cykloalkylových skupin. Příkladem je 1,3-dipropyl-8-cyklopentylxantin (DPCPX), který se používal jako radioligand a farmakologická sonda pro *in vivo* studie. 1,3-dipropylxantinům byla věnována větší pozornost a optimalizací vzniklo několik sloučenin, které dosáhly stádia testování v klinických pokusech. Jednou z nich je KW3902 (3-noradamantyl-1,3-dipropylxantin), označovaný jako rolofylline a testuje se jako potenciální diuretikum (Kiesman *et al.*, 2009).

Ve výzkumu jsou také nexantinové deriváty. Největší skupinu tvoří 6:5-fúzané heteroaromatické sloučeniny s dusíkem, jako jsou pyrazolopyridiny, imidazopyridiny, benzimidazoly. Jeden ze slibných pyrazolopyridinových derivátů je sloučenina FK-453 a 7-deazadeninový derivát SLV320 (Chang *et al.*, 2004).



Obr. 5: Antagonisté  $A_1$  receptoru: DPCPX (vlevo) a rolofylline (vpravo)

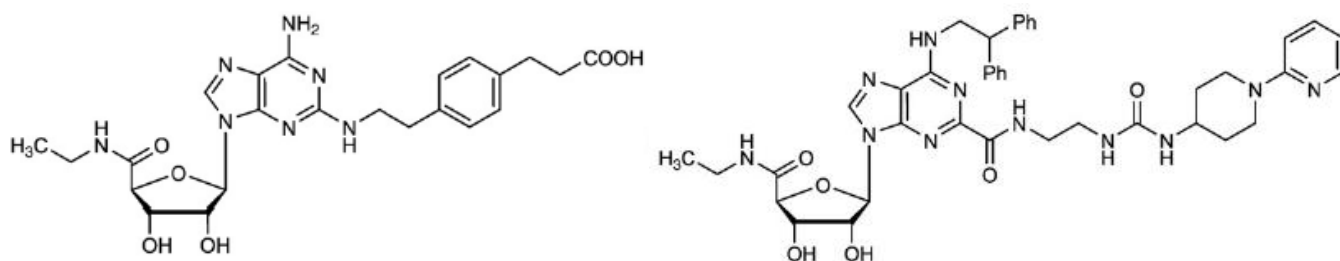
## $A_{2A}$ SELEKTIVNÍ AGONISTÉ A ANTAGONISTÉ

Doposud byly  $A_{2A}$  receptory nalezeny především v oblastech bohatých na dopamin v CNS, ale také v glutamatergických a GABAergických drahách v hipokampu a v kortexu. Nicméně geny tohoto receptoru jsou exprimovány také v hladké svalovině, neuronech sympatických i parasympatických drah, cévách, endoteliálních a lymfoidních buňkách. Ligandy  $A_{2A}$  receptoru jsou vyvíjeny zejména pro jejich potenciální využití jako léčiva několika patologických stavů, které s aktivitou tohoto receptoru souvisí. Jedná se o neurodegenerativní poruchy, záněty a hojení ran. Problémem prozatím klinických testů jsou vedlejší efekty způsobené rozšířením adenosinových receptorů. Proto je potřeba získat co nejvíce selektivní ligandy (Clementina & Giuseppe, 2010).

První  $A_{2A}$  agonisté obsahovali opět klasickou nukleosidovou strukturu, obvykle adenosinový motiv. Mnoha pokusy modifikovat adenosinovou strukturu se došlo k závěru, že adenosinový motiv musí být konzervován ve strukturálním centru agonisty. Základem tvorby  $A_{2A}$  agonistů byl obecný poznatek, že chemická modifikace na N<sup>6</sup>, C2- nebo C5'-pozici prodlužuje ischemickou vazodilatační aktivitu (Cristalli *et al.*, 2003). Byla vytvořena série adenosinových derivátů substituovaných na C2-pozici alkoxy, alkyl, amino nebo merkaptó skupinou (Clementina & Giuseppe, 2010). Bylo také

zjištěno, že přítomnost 5'-N-alkyluronamidové modifikace (která se vyskytuje v neselektivním agonistovi NECA) zvyšuje selektivitu pro A<sub>2A</sub> receptor. Tyto dvě modifikace se vyskytují v široce užívaném agonistovi CGS21680. V této sloučenině nalezneme v prodlouženém řetězci 2-(2-phenylethyl)amino modifikaci, která částečně napomáhá zvýšení afinity k receptoru a karboxylová skupina v terminální části funguje jako obecné místo pro prodlužování řetězce a derivatizaci velkými, např. fluorescenčními skupinami bez vlivu na afinitu (Müller & Jacobson, 2011).

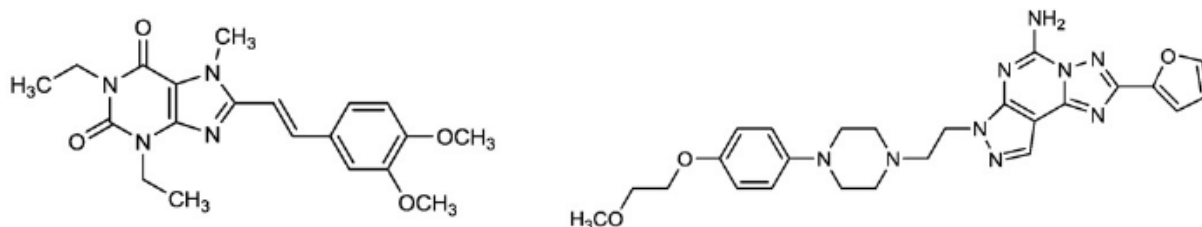
Některé substituce na N<sup>6</sup>-pozici mohou napomáhat afinitě receptoru. Příkladem je třída N<sup>6</sup>-(2,2-diphenylethyl) adenosinových analogů, jako je UK-432097. Pro klinické účely byl vytvořen regadenoson, který je schopen diagnostikovat stres způsobený vazodilatačními efekty. Pro stejné účely je vyvíjen také apadenoson. Několik dalších selektivních agonistů (včetně UK-432097) bylo klinicky testováno. Největším problémem systematické aplikace těchto agonistů jako protizánětlivých látek jsou jejich silné hypotenzní účinky. Proto je snaha získat agonisty, které vykazují místně-specifickou aktivitu (Müller & Jacobson, 2011). Například výše zmíněný UK-432097 je vyvíjen pro léčbu zánětu průdušek inhalací, čímž se limitují systémové účinky (Mantell *et al.*, 2009).



Obr. 6: Agonisté A<sub>2A</sub> receptoru: CGS21680 (vlevo), UK-432097 (vpravo)

Při výzkumu A<sub>2A</sub> selektivních antagonistů se ke zvýšení selektivity uplatnila modifikace xantinů na C8-pozici alkeny (zejména styrylové skupiny). Mezi prvními byl 8-styrylxantin istradefylline (KW6002). MSX-3 a MSX-4 jsou ve vodě rozpustné prekurzory MSX-2, který je silným, selektivním A<sub>2A</sub> antagonistou. Oba dva se proto široce využívají jako farmakologické nástroje zejména pro in vivo studie (Müller & Jacobson, 2011).

Substituce různých heterocyklických kruhů v xantinovém jádře vede k velmi vysoké afinitě a selektivitě. Jako jeden z prvních příkladů byl CGS15943 (triazoloquinazoline), u kterého se později ukázalo, že je pouze lehce selektivní. Úpravami, přidáním třetího kruhu nebo změnami zařazení dusíku v heterocyklickém systému se selektivita výrazně zvýšila. Příkladem takového antagonisty je ZM241385, který se váže také k A<sub>2B</sub> receptoru se středně velkou afinitou a užívá se tak jako radioligand tohoto receptoru (Alexander & Millns, 2001). Kromě xantinových derivátů se zkoumají další antagonisté, například sloučenina preladenant (SCH 420814), která je v klinických testech pro léčbu Parkinsonovy choroby (Müller & Jacobson, 2011).



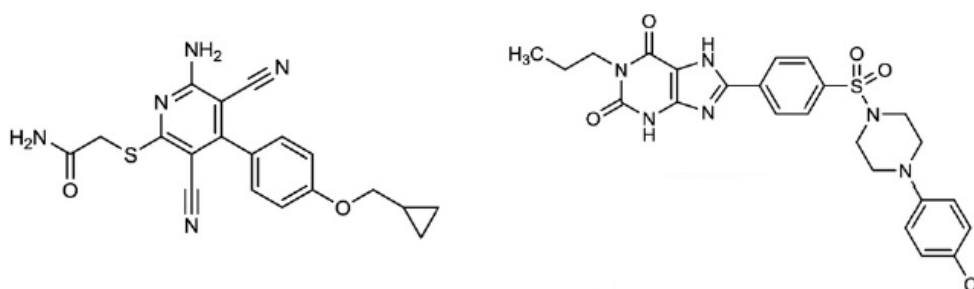
Obr. 7: Antagonisté  $A_{2A}$  receptoru: KW6002 (vlevo) a preladenant (vpravo)

### $A_{2B}$ SELEKTIVNÍ AGONISTÉ A ANTAGONISTÉ

Fyziologická role  $A_{2B}$  receptoru prozatím není dostatečně prozkoumaná, ale byl zjištěn jeho význam v různých procesech. Mimo jiné aktivace tohoto receptoru podporuje rozvoj plicních zánětů a antagonisté by tedy mohli být užiteční v léčbě astmatu nebo chronické obstrukční plicní nemoci. Inhibice  $A_{2B}$  receptoru by se mohla uplatnit také při léčbě rakoviny.  $A_{2B}$  receptor má zvýšenou expresi v některých nádorových buňkách, a protože je v nádorech chronicky hypoxické prostředí, infiltrující imunitní buňky také vykazují zvýšenou expresi  $A_{2B}$  receptoru (Thimm *et al.*, 2013).

Nicméně agonisté tohoto adenosinového receptoru mohou být také terapeuticky zajímaví. Aktivace  $A_{2B}$  receptoru zprostředkovává kardioprotektivní procesy a ukázalo se, že selektivní agonisté mohou snížit míru aterosklerózy u myši nebo chránit proti endotoxiny indukovanému poškození plic. Popsáno však bylo doposud pouze několik agonistů. Většina z nich jsou analoga adenosinu, neselektivní a dokonce méně účinná než u ostatních receptorových podtypů. Vysoce selektivní  $A_{2B}$  agonista je aminopyridin BAY60-6583.

$A_{2B}$  antagonisté jsou převážně 8-substituované deriváty xantinu. Jeden z nejselektivnějších doposud známých antagonistů  $A_{2B}$  receptoru je PSB-603 (Thimm *et al.*, 2013).



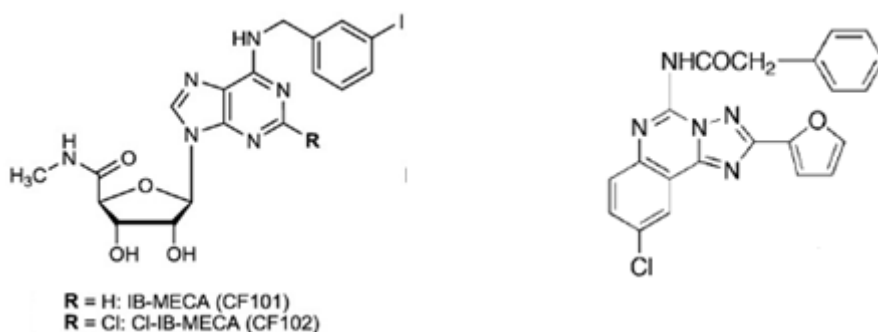
Obr. 8: Agonista a antagonistu  $A_{2B}$  receptoru: BAY60-6583 (vlevo) a PSB-603 (vpravo)

### $A_3$ SELEKTIVNÍ AGONISTÉ A ANTAGONISTÉ

$A_3$  adenosinový receptor se také podílí na mnoha cytoprotektivních efektech. Selektivní agonisté prokázali schopnost chránit srdeční sval v několika ischemických modelech a jsou protektivní proti kardiotoxickým účinkům protinádorového léčiva doxorubicinu (Shneyvays *et al.*, 2001).

Agonisté  $A_3$  receptoru jsou výhradně nukleosidové deriváty. Nejužitečnější modifikace adenosinu k dosažení vysoké afinity a selektivity jsou na  $N^6$  nebo C2 pozici adeninu nebo na ribózové skupině adenosinu. Prvním selektivním agonistou byla sloučenina IB-MECA ( $N^6$ -(3-iodobenzyl)-5'-N-methylkarboxamidoadenosine) a společně se svým ještě více selektivním 2-chloro analogem se stal nejužívanějším a nejrozšířenějším farmaceutickým nástrojem (Jacobson *et al.*, 2009). Ribózový kruh se ve vodném prostředí klasicky volně otáčí a může přijmout řadu konformací. Preferovanou konformaci pro vazbu  $A_3$  receptoru je možno v analogách obsahujících bicyklohexanový kruh chemicky zmrazit v místě 5-ti členného kruhu. Tímto je možno vytvářet ještě účinnější a selektivnější agonisty jako například MRS3558 (Müller & Jacobson, 2011).

Při vývoji antagonistů se objevil problém určení hlavní struktury. Antagonisté ostatních adenosinových receptorů jsou převážně xantinové deriváty. Nicméně xantiny mají typicky mnohem slabší vazbu k  $A_3$  receptoru než k ostatním podtypům. Pozornost se proto zaměřila na výzkum heterocyklických sloučenin. Jedním z prvních selektivních heterocyklických derivátů byl MRS1220. Během zkoumání různých chemicky odlišných tříd bylo identifikováno několik dalších molekul vykazujících  $A_3$  selektivitu: 1,4-dihydropyridiny, pyridiny a flavony (Jacobson *et al.*, 2009).



Obr. 9: Agonista a antagonistu  $A_3$  receptoru: IB-MECA (vlevo) a MRS1220 (vpravo)

### Neselektivní agonisté a antagonisté

Základním ligandem adenosinových receptorů je samotný adenosin, který byl dlouhou dobu jediným klinicky využívaným agonistou. Podobně základní skupinou antagonistů jsou methylxantiny, přirozeně se vyskytující sloučeniny v různých rostlinách. Rozlišením a identifikací jednotlivých podtypů adenosinových receptorů došlo také k rozvoji studia ligandů a možnosti jejich terapeutického využití. Každý podtyp receptoru má unikátní výskyt, vlastnosti a vliv na odlišné patologické stavy, a proto je snaha vytvářet co nejvíce selektivní ligandy.

V popředí zájmu stále zůstávají nejběžněji využívané neselektivní methylxantiny, kofein a teofylin (Müller & Jacobson, 2011).



## **Alosterické modulace**

Adenosinové receptory je možno alostericky regulovat. Kromě vazebného místa pro orthosterické primární ligandy (endogenní adenosin a jeho deriváty) zde nalezneme alosterické vazebné místo pro alosterické modulátory. Vazba alosterického ligandu způsobí změnu konformace receptoru a možnou změnu vazebné schopnosti orthosterického ligandu. Z hlediska patofyziologických účinků adenosinu se spekuluje nad potenciálním využitím alosterických enhancerů při kardiovaskulárních problémech (arytmie, ischemie), diabetu, rakovině, autoimunitních chorobách nebo chronických zánětlivých reakcích (Göblyös & Ijzerman, 2011). Alosterické enhancery by totiž mohly poskytnout selektivnější terapeutický efekt. Jejich aktivita by byla omezena časově i lokálně, při určitém signifikantním uvolnění adenosinu (například během hypoxie, kdy dochází ke zvýšené lokální produkci adenosinu). Tímto by se omezily systémové vedlejší efekty (Baraldi *et al.*, 2007).

### **A<sub>1</sub> RECEPTOR**

Mezi prvními alosterickými enhancery byla zkoumána sloučenina PD 117,975 (4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridinový derivát). Syntézou analogů této sloučeniny se ukázalo, že tetrahydropyridinový kruh není esenciální, protože může být nahrazen tetrahydrobenzenovým jádrem, případně může být, bez vlivu na aktivitu, odstraněn úplně. Podobný efekt na zvýšení aktivity receptoru měly sloučeniny PD 81,723 a PD 71,605.

Problémem je, že zároveň s funkcí enhancerů se tyto sloučeniny chovají jako kompetitivní antagonisté těch samých receptorů. Jejich koncentrace musí být limitována, aby se aktivita zvýšila. Nejlepší poměr aktivity enhancer/antagonista prokázala sloučenina PD 81,723 a stala se tak referenčním alosterickým modulátorem adenosinového receptoru A<sub>1</sub> (Baraldi *et al.*, 2007).

### **A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> RECEPTORY**

Pro A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> adenosinové receptory nebyly dosud popsány selektivní alosterické modulátory. Lze nalézt pouze několik sloučenin, které se chovají jako modulátory A<sub>2A</sub> receptoru. PD 120,918 působí zvýšení vazby agonisty u A<sub>2A</sub> receptoru ve striatu potkana, ale bez jakéhokoliv funkčního zvýšení aktivity. Jako ostatní GPCRs je i A<sub>2A</sub> receptor alostericky modulován sodnými ionty a amiloridem, který funguje jako alosterický inhibitor (Giorgi *et al.*, 2008).

Alosterické modulátory pro A<sub>2B</sub> receptor doposud nebyly prozkoumány. Prozatím neexistuje vhodný radioligand, který by byl komerčně dostupný.

## A<sub>3</sub> RECEPTOR

Jako první alosterické enhancery A<sub>3</sub> receptoru byly popsány deriváty 3-(2-pyridinyl)isoquinolinu (Gao *et al.*, 2001). V předchozích studiích byly tyto deriváty identifikovány pouze jako potenciální antagonisté A<sub>3</sub> receptoru (van Muijlwijk-Koezen *et al.*, 1998).

Následně byly tvořeny chemické sloučeniny a deriváty fungující jako alosterické modulátory, se snahou optimalizovat aktivační a antagonistické účinky. Sloučenina VUF5455 vykazuje pouze mírnou afinitu jako orthosterický antagonist. Některé její úpravy dokázaly afinitu ještě snížit, ale zároveň došlo ke ztrátě alosterických schopností. VUF5455, i když vykazuje mírnou antagonistickou aktivitu, lze považovat za vůdčí sloučeninu v designování alosterických enhancerů A<sub>3</sub> receptoru (Göblyös & Ijzerman, 2011).

## Signalizace

Nadbytek extracelulárního adenosinu je hlavním znakem metabolického stresu. Je tvořen z ATP, které se do extracelulárního prostoru dostává pomocí Na<sup>+</sup> dependentních transportérů. Během hypoxie je adenosin akumulován v ještě větších koncentracích. Například v srdci je hladina extracelulárního adenosinu při hypoxii zvýšena téměř 20x, tedy dosahuje více než 1 μM koncentrace. Adenosin je však poměrně nestabilní a jeho poločas života je limitován deaminací nebo zpětným vychytáváním. Hypoxicky zvýšená hladina adenosinu proto ovlivňuje pouze lokální receptorovou signalizaci (Klinger *et al.*, 2002).

Všechny adenosinové receptory patří mezi GPCRs. Původně byly klasifikovány podle afinity k adenosinu a methylxantinovým antagonistům na P<sub>1</sub> a P<sub>2</sub> třídu, a následně do dnes známých čtyř podtypů A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> a A<sub>3</sub> (Fredholm *et al.*, 1994). Společně jsou exprimovány téměř všude v organismu, takže adenosin prakticky kontroluje funkci všech orgánů a tkání. Adenosinové receptory se dělí také podle mechanismů signální transdukce. A<sub>1</sub> a A<sub>3</sub> receptory interagují s G<sub>i</sub> a G<sub>o</sub> proteinovou rodinou, zatímco A<sub>2A</sub> a A<sub>2B</sub> receptory stimulují adenylátcyklázu přes G<sub>s</sub> proteiny. A<sub>2B</sub> receptory navíc aktivují fosfolipázu C, což je zprostředkováno aktivací G<sub>q/11</sub> proteinů (Klinger *et al.*, 2002).

Heterotrimerní G proteiny jsou proteinové komplexy vázající guaninové nukleotidy, které se skládají z α a βγ podjednotek. Zprostředkovávají přenos signálů z GPCRs na efekторы (například adenylátcyklázu). Rozdělují se do několika tříd podle specifických aktivit. G<sub>s</sub> proteiny stimulují adenylátcyklázu, G<sub>i</sub> proteiny inhibují adenylátcyklázu a stimulují GIRK kanály, G<sub>o</sub> proteiny stimulují K<sup>+</sup> iontové kanály, G<sub>q/11</sub> proteiny aktivují fosfolipázu C, G<sub>12</sub> proteiny aktivují GEFs (výměnné faktory guaninových nukleotidů) a G<sub>olf</sub> proteiny spřažené s čichovými receptory stimulují adenylátcyklázu.

Předávat signál může jak  $\alpha$ , tak  $\beta\gamma$  podjednotka, ale jejich cílem mohou být odlišné efektorové molekuly (Klaasse *et al.*, 2008).

Z předchozího popisu vyplývá, že základními prvky adenosinové signalizace jsou receptory, G proteiny a efekty. Nicméně mnoho dalších proteinů ovlivňuje signalizační reakce tím, že interagují přímo s receptory nebo G proteiny. Mezi hlavní patří kinázy GPCRů (GRK) a arrestiny, které jsou zodpovědné za receptorovou desenzitizaci (Klinger *et al.*, 2002).

Podtyp adenosinového receptoru	G protein	Fyziologický účinek spřažení G proteinu s receptorem	Buněčná linie	Zdroje
$A_1$	$G_{i1/2/3}$	↓ cAMP	obecná, CHO buňky	Akbar <i>et al.</i> 1994; Freund <i>et al.</i> 1994; Jockers <i>et al.</i> 1994; Gerwins and Fredholm 1995
		↑ $IP_3$ /DAG (PLC)		
		↑ arachidonát ( $PLA_2$ )		
		↑ cholin (PLD)	DDT <sub>1</sub> MF-2	Freissmuth <i>et al.</i> 1991
	$G_o$	–	–	Jockers <i>et al.</i> 1994
$A_{2A}$	$G_s$	↑ cAMP	obecná	Olah 1997
	$G_{olf}$	↑ cAMP	striatum, CHO buňky	B. Kull <i>et al.</i> 2000
	$G_{15/16}$	↑ $IP_3$	COS-7	Offermanns and Simon 1995
$A_{2B}$	$G_s$	↑ cAMP	obecná	Pierce <i>et al.</i> 1992
	$G_{q/11}$	↑ $IP_3$ /DAG (PLC)	HMC-1, HEK293	Gao <i>et al.</i> 1999; Linden <i>et al.</i> 1999
$A_3$	$G_{i2,3}$	↓ cAMP	obecná, CHO buňky	Palmer <i>et al.</i> 1995
	$G_{q/11}$	↑ $IP_3$ /DAG (PLC)	CHO buňky	Palmer <i>et al.</i> 1995

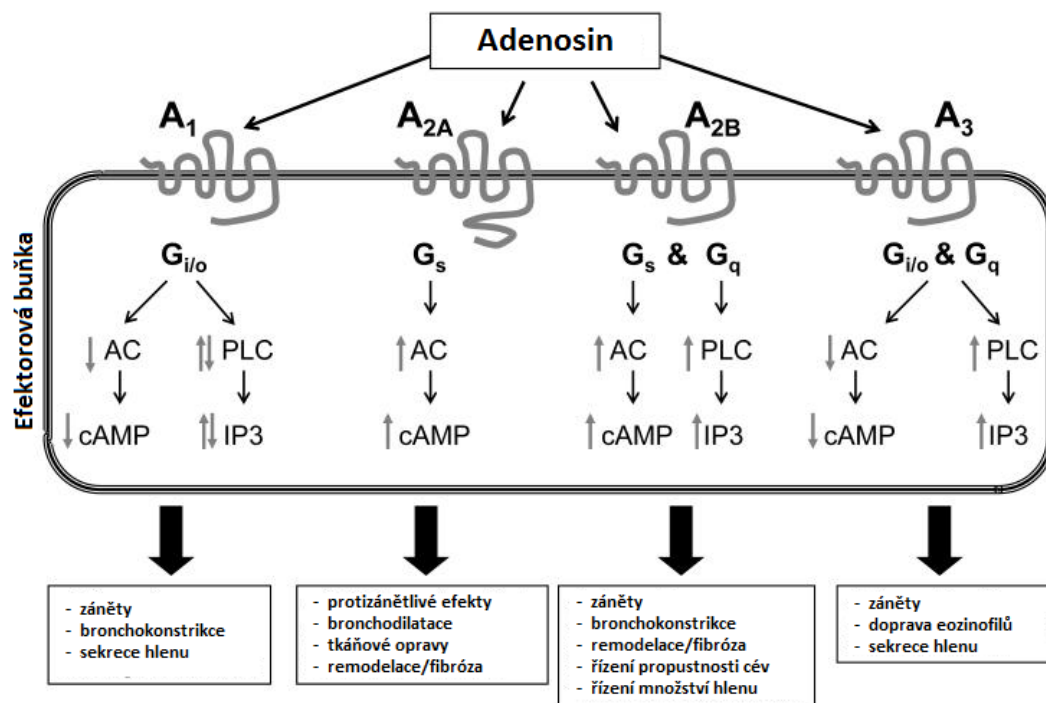
Tab. 1: Adenosinové receptory: interakce s G proteiny a jejich fyziologické účinky (upraveno podle McNeely *et al.*, 2012)

## Sekundární posli a signály

Aktivované G proteiny ovlivňují řadu enzymů a iontových kanálů, které dále přenášejí signál aktivací nebo uvolněním druhých poslů (obecné účinky lze vidět v Tab. 1). Mezi inhibiční adenosinové receptory se řadí receptor  $A_1$  a  $A_3$ . Jejich aktivací je zprostředkována signalizace přes  $G_i$  proteiny, které inhibují adenylátcyklázu a tedy potlačují tvorbu cAMP. Nejedná se však o jedinou dráhu ovlivněnou těmito receptory.  $A_1$  receptor může aktivovat několik typů  $K^+$  kanálů, inaktivovat N, P a Q- typ  $Ca^{2+}$  kanálů nebo aktivovat fosfolipázu  $C\beta$ . Stejně účinky má zřejmě  $A_3$  receptor, ale doposud k tomuto tvrzení chybí přesvědčivé důkazy.  $A_{2A}$  a  $A_{2B}$  receptory se označují jako stimulační, protože přes  $G_s$  proteiny aktivují adenylátcyklázu a produkci cAMP. Mezi jejich další významné role patří mobilizace intracelulárního vápníku (McNeely *et al.*, 2012).

Kromě efektů závislých na hladině cAMP, adenosinové receptory přenášejí signály pomocí MAP kináz. Jedná se o několikastupňovou fosforylační kaskádu, ve které každá předchozí kináza fosforyluje, a tedy aktivuje, kinázu následující. MAP kinázy hrají důležitou roli v buněčné diferenciaci,

proliferaci a smrti. Obvykle jsou aktivovány přes tyrosinkinázové receptory, ale bylo prokázáno, že mohou být aktivovány také pomocí GPCRů, zejména přes adenosinové receptory. Nicméně dráhy signální transdukce vedoucí od GPCRů k MAP kinázám ovlivňující buněčný osud nejsou doposud detailně prozkoumány a mohou se lišit v jednotlivých buněčných typech (McNeely et al., 2012).



Obr. 10: Adenosinová signalizace (upraveno podle Polosa & Blackburn, 2009)

## Desenzitizace a internalizace

Desenzitizace snižuje aktivitu receptoru a hraje tak roli v délce trvání signálu, jeho intenzitě a kvalitě. Jako první proběhne fosforylace serinového nebo treoninového zbytku ve třetí intracelulární smyčce a na C-konci receptoru. Mohou nastat dva způsoby desenzitizace: heterologní nebo homologní (oba dva jsou výsledkem fosforylace receptoru).

Heterologní desenzitizace je vyvolána fosforylací receptoru proteinkinázou A nebo C. Receptor přitom nemusí být obsazen agonistou. Oproti tomu homologní desenzitizace je specifická pro agonistou obsazené receptory. Prvním krokem je fosforylace receptoru jednou z GRK. Následně se naváže  $\beta$ -arrestin, který stericky inhibuje spřažení receptoru s G proteiny. Může také receptor směřovat do klatrinem pokrytých jamek a následně dochází k internalizaci.

$\beta$ -arrestiny neinteragují pouze s fosforylovaným receptorem, ale také s těžkým řetězcem klatrinu. Díky tomu dokážou receptor navést na oblasti membrány obsahující klatrin. Následně vytvořené klatrinové váčky obsahující receptory jsou pomocí dynaminu odštěpeny z plazmatické

membrány a internalizovány. Receptory mohou být poté rychle recyklovány zpět do plazmatické membrány, postoupit do pozdních endosomů nebo být degradovány v lysozomech. Konečný cíl internalizovaného receptoru je určen podtypem navázaného  $\beta$ -arrestinu (1 nebo 2) a délkou jeho vazby (Klaasse et al., 2008).

## Interakce

Adenosinové receptory se na buněčném povrchu vyskytují převážně v homodimerické formě. Jsou však schopny interagovat také s jinými receptory a vytvářet heteromery. Příkladem je antagonistický vztah adenosinu a dopaminu. V mnoha studiích bylo potvrzeno, že adenosinové agonisté nebo antagonisté mohou působit jako silná léčiva proti Parkinsonově chorobě. Tohoto účinku je dosaženo faktem, že adenosinové agonisté inhibují a antagonisté (např. kofein) zesilují behaviorální účinky dosažené dopaminovými agonisty. Zmíněný antagonistický vztah je alespoň částečně způsoben intramembránovými interakcemi mezi některými podtypy dopaminových a adenosinových receptorů, konkrétně mezi  $A_1$  a  $D_1$  nebo  $A_{2A}$  a  $D_2$  receptory. Tyto receptory jsou lokalizovány v bazálních gangliích, přesněji v GABAergních neuronech striata (Ferre et al., 1997).

Stimulace  $A_{2A}$  receptoru snižuje afinitu agonistů k  $D_2$  receptoru, přičemž se nemění afinita antagonistů. Tento efekt pravděpodobně nijak neovlivňuje G proteiny. Jak adenosinové, tak dopaminové receptory mají aktivační nebo inhibiční vliv na adenylátcyklázu, a proto vzájemné antagonistické stavy mohou částečně ovlivňovat hladinu druhého posla cAMP (Ferre et al., 1997).

Jinou skupinou receptorů, které potenciálně interagují s adenosinovými receptory, jsou metabotropní glutamátové receptory. Podrobněji byla studována interakce mezi  $mGlu_{1\alpha}$  a  $A_1$  receptorem.  $mGlu_{1\alpha}$  receptory se podílí na neurodegenerativních onemocněních jako je Alzheimerova choroba, a proto je v popředí zájmu výzkum molekulárních interakcí, které by mohly být využity k vývoji nových léčebných metod (Ciruela et al., 2001).

Společnou aktivitu homo- nebo heteromerů zajišťují alosterické mechanismy. Obecně je alosterie způsob komunikace mezi vzdálenými částmi proteinu. Existuje několik teorií popisujících alosterický mechanismus. Starší názor popisuje schopnost jednoho vazebného místa ovlivnit aktivitu jiného vazebného místa přes konformační změnu. Novější teorie naopak tvrdí, že proteiny existují v určitých dynamických a konformačních stavech, které jsou ovlivněny deformační energií uvolněnou z alosterického do substrátového místa. Jedná se tedy o termodynamický fenomén. Vyplývá z toho, že během alosterie nemusí docházet ke konformačním změnám ve vazebném místě, je to pouze jedna z možností (Fuxe et al., 2012).

Jak samotná dimerizace probíhá a jaké molekulární mechanismy se podílí na tomto procesu, není doposud zcela známo. Asociace GPCRs monomerů do dimerů může probíhat různými způsoby.

Jedním z nich je dimerizace založená na kontaktu domén, což popisuje interakci molekulárních povrchů ve specifických vazebných místech bez toho, aby se výrazně měnila konformace monomeru. Jiná možnost dimerizace, označována jako výměna domén, je mechanismus založený na výměně domény jednoho monomeru s odpovídající doménou monomeru druhého. Přitom tedy dojde k obrovské konformační změně monomeru (Fuxe et al., 2012).

Adenosinové receptory jsou spřažené s G proteiny a jejich heterodimerizace by tedy mohla mít vliv na tuto vazbu a následnou signalizaci. Platí zde základní model minimální signalizační jednotky v homomeru. Jedna helikální doména v aktivní konformaci váže G protein, zatímco sousední receptor zde spíše překáží (Fuxe et al., 2012).

## Patologie

Jak již bylo uvedeno, adenosinové receptory díky svému rozšíření ovlivňují většinu tkání a orgánů lidského těla. Pro studium patologických vlivů je primárním poznatkem výskyt a množství daného receptoru. A<sub>1</sub> receptor se vyskytuje převážně v centrálním nervovém systému (CNS). Vysokou hladinu vykazuje v mozkové kůře, hipokampu, mozečku, thalamu, mozkovém kmeni a v míše. Nalezneme jej také v některých periferních tkáních, například v tukové tkáni, žaludku, slezině, srdci, játrech, oku nebo v močovém měchýři. Mimo to jsou nízké hladiny A<sub>1</sub> receptoru v plicích, ledvinách a tenkém střevě. A<sub>1</sub> receptor se tedy může účastnit kardiovaskulárních poruch, inhibice lipolýzy a stimulace příjmu glukózy v adipocytech nebo uvolnění neurotransmiterů v CNS. Může hrát také roli ve stavech úzkosti, hyperalgezií, bronchokonstrikci a glomerulární filtraci v ledvinách (Fredholm et al., 2011).

A<sub>2A</sub> receptor je v CNS exprimován převážně ve striatu. Na periférii vykazuje vysokou hladinu exprese slezina, brzlík, leukocyty a krevní destičky a neméně také srdce, plíce a cévy. A<sub>2A</sub> receptor se proto může účastnit vasodilatace, inhibice agregace destiček, ale také exploračního chování, agresivity nebo hypoalgie. Navíc se může uplatnit při Parkinsonově, Alzheimerově, Huntingtonově chorobě a ischemii (Trincavelli et al., 2010).

A<sub>2B</sub> receptory byly nalezeny ve slezině, plicích, střevech a ledvinách, přičemž ve všech těchto orgánech byly primárně exprimovány v cévním systému. Určité množství tohoto receptoru vykazují i hladké svalové buňky, endoteliální buňky a makrofágy. Kvůli nedostatku specifických agonistů se o funkčním využití A<sub>2B</sub> receptoru ví velmi málo. Nicméně se může účastnit alergických a zánětlivých onemocnění (Klotz, 2000).

A<sub>3</sub> receptor je také exprimován v CNS, ale v nízkých hladinách, a to pouze v hypothalamu a thalamu. Nejvyšší koncentrace byla nalezena v plicích, játrech a aortě. Navíc se vyskytuje

v eozinofilech, žírných buňkách, varlatech, ledvinách, placentě, srdci, slezině, děloze nebo v oku.  $A_3$  receptor zprostředkovává alergické odpovědi a apoptózu určitých buněčných typů. Účastní se kontroly buněčného cyklu a inhibice nádorového růstu. Dokonce bylo prokázáno, že je exprimován více v nádorových buňkách než ve zdravých, což by mohlo vést k použití  $A_3$  receptoru jako nádorové značky (Trincavelli et al., 2010).

## Neurologická onemocnění

Jedno z prvních terapeutických využití adenosinu bylo jako endogenní antikonvulzivum (léčivo proti křečím, epileptickým záchvatům). Je známo, že adenosinový systém se významně podílí v regulaci proliferace astrocytů, která vede k astrocytóze, což je charakteristický znak epilepsie. Anti-epileptické vlastnosti adenosinu jsou dány hlavně inhibičním efektem presynaptických  $A_1$  receptorů na uvolňování glutamátu.

Adenosin také komplexně ovlivňuje bolest. Může působit přes inhibiční (antinociceptivní) systém CNS, stejně jako přes systém facilitační (pronociceptivní). Záleží na místě aplikace nebo typu receptorů. Největší zájem je z terapeutického hlediska zaměřen na  $A_1$  receptor, který zprostředkovává antinociceptivní odpovědi. V poslední době byl prokázán význam  $A_{2A}$  receptoru a jeho antagonisté by mohli být využiti k modulaci chronické bolesti. Uvažuje se, že  $A_{2A}$  receptor má silný potenciál stát se novým cílem kontroly bolesti (Trincavelli et al., 2010).

Mnoho studií popisuje vliv adenosinu na spánkový cyklus. Množství extracelulárního adenosinu se v předním mozku zvyšuje během dlouhodobého bdění a snižuje během spánku. Nicméně zdroj extracelulárního adenosinu ve spánkovém cyklu není dostatečně jasný. Zprostředkování adenosinové regulace spánku zajišťují  $A_1$  a  $A_{2A}$  receptory. Mnoho farmakologických studií popisuje regulaci spánkového cyklu pomocí  $A_1$  receptoru v předním mozku. Oproti tomu funkce  $A_{2A}$  receptoru pramení ze studií zkoumajících nabuzení díky neselektivnímu antagonistovi kofeinu (Wei *et al.*, 2011). Potvrzuje to i nedávná studie prokazující, že různé genetické varianty genu  $A_{2A}$  receptoru (ADORA2A) jsou spojeny s individuální senzitivitou ke kofeinu, tedy k jeho vlivu na spánek (Retey *et al.*, 2007).

Endogenní adenosin přes aktivaci  $A_1$  receptorů zprostředkovává fenomén zvaný dlouhodobá potenciace (long-term potentiation, LTP) nebo deprese (long-term depression, LTD). Jedná se o dlouhodobé zvýšení nebo snížení signální transmise mezi neurony, a je to jedna ze základních složek synaptické plasticity. LTP je považován za jeden z hlavních buněčných mechanismů, který je základem učení a paměti. Procesy synaptické aktivity se obvykle týkají neurotransmiterů jako dopamin a glutamát, přičemž adenosin jako známý modulátor ovlivňuje tyto procesy právě regulací uvolňování těchto neurotransmiterů. Antagonisté  $A_1$  receptoru jsou studováni pro léčbu poruch paměti (Trincavelli et al., 2010).

Důležité je zmínit vliv adenosinu na motorické funkce člověka. Adenosinová regulace motorické aktivity probíhá především přes  $A_{2A}$  receptory. Nejstudovanějším patologickým projevem zahrnující funkci adenosinových receptorů je jistě Parkinsonova choroba. Nedostatek dopaminu vytváří nerovnováhu v aktivitě výstupních striatálních drah. Striatonigrální neurony (vedoucí ze striata do substantia nigra neboli černé substance, která mimo jiné zásobuje striatum dopaminem) se stanou hypoaktivními, zatímco striatopallidární neurony se díky ztrátě inhibičního vlivu dopaminu a stimulace adenosinem stanou hyperaktivními. Taková nerovnováha vede k hypokinetickým syndromům Parkinsonovy choroby. Antagonisté  $A_{2A}$  receptoru by měli blokovat tento receptor na striatopallidárních neuronech, což by mělo utlumit jejich aktivitu a částečně obnovit rovnováhu mezi striatopallidárními a striatonigrálními neurony. Tento mechanismus zdůvodňuje jak použití  $A_{2A}$  antagonistů pro léčbu Parkinsonovy choroby, tak jejich synergistické vztahy s dopaminergními agonisty (Trincavelli et al., 2010). Zajímavá epidemiologická data popisují mimo jiné vliv konzumace kávy. Výsledkem bylo zjištění, že konzumenti kávy mají nižší riziko vzniku Parkinsonovy choroby. Tento jev je spojován s interakcí kofeinu s  $A_{2A}$  receptorem, který v bazálních gangliích spolu s dopaminem ovlivňuje lokomoční chování (Hernan et al., 2002).

### **Psychiatrická onemocnění**

Agonisté  $A_1$  receptoru vykazují u hlodavců funkci anxiolytik, léčiv k odstranění úzkosti. Naopak kofein a selektivní  $A_1$  antagonisté jsou anxiogenní (vyvolávají úzkost). Kofein se váže také na  $A_{2A}$  receptor a může mít takto vliv na výskyt panických poruch. Bohužel ani pro jeden receptor doposud nejsou dostatečně konzistentní data podporující uváděné teorie (Wei et al., 2011).

Role adenosinu v poruchách nálad je podporována třemi liniemi výzkumu. První je důkaz, že konzumace kávy (přesněji kofeinu) může měnit nálady jak dobrovolníků, tak psychiatrických pacientů. Druhým důkazem je vliv různých terapeutických strategií léčby poruch nálad na adenosinový systém. Třetím je poznatek ze zvířecích modelů, že manipulace s adenosinovými receptory modifikuje chování, které je u lidí spojováno se změnami nálad.

Návykové látky působí na člověka několika mechanismy, které dohromady vytváří komplexní chování zahrnující konzumaci drog, jejich vyhledávání, odvykání a relaps. Adenosin jako neuromodulátor hraje roli v takzvané odměně a motivaci po požití. Množství adenosinu je po požití návykové látky zvýšeno a  $A_{2A}$  receptory jsou přítomny ve vyšší míře v mozkových jádrech, které podporují procesy posílení, motivace spojené s drogami. Navíc jsou  $A_{2A}$  receptory často v kontaktu s receptory dopaminovými a glutamátovými, které přes neurotransmitery zajišťují neuronální odpovědi a plasticitu, která je základem užívání drog a jejich vyhledávání.  $A_{2A}$  receptory jsou také zapojeny v hypnotických efektech etanolu (Trincavelli et al., 2010).



## Rakovina

V nádorovém mikrostředí je zvýšená hladina extracelulárního adenosinu kvůli zánícení a hypoxii.  $A_{2B}$  receptor může podporovat šíření karcinomu plic tím, že přeprogramuje dendritické buňky k produkci obrovského množství VEGF a tím dojde k podpoře angiogeneze v nádoru. Zvýšená exprese  $A_{2B}$  receptoru byla pozorována i v jiných typech nádorů, proto je pravděpodobné, že přímo přispívá ke zvýšenému nádorovému růstu.

Velmi zajímavá oblast ve výzkumu rakovinných léčiv zahrnuje aplikaci ligandů  $A_3$  receptoru. V normálních podmínkách (za dostatku kyslíku) byl pomocí  $A_3$  receptoru inhibován nádorový růst přes regulaci WNT signální dráhy. Tato dráha je aktivní během embryogeneze i tumorogeneze a zprostředkovává průběh buněčného cyklu a buněčnou proliferaci (Fishman *et al.*, 2004).

Na druhou stranu jsou pro nádory typické hypoxické podmínky. Během hypoxie dochází k akumulaci extracelulárního adenosinu, ale také se stabilizují hypoxické faktory jako například HIF-1. Zvýšená hladina adenosinu aktivuje  $A_3$  receptory a přes MAP kinázy dochází ke zvýšení koncentrace HIF-1, který ovlivňuje angiogenezi, invazi a celkový energetický metabolismus nádoru. Výsledkem je zvýšení VEGF a angiogeneze. Tyto úvahy svědčí pro možnost tumorogenního efektu  $A_3$  receptoru a antagonisté těchto receptorů by proto mohli sloužit jako protinádorové látky (Trincavelli *et al.*, 2010).

## Závěr

Adenosinové receptory se vyskytují téměř ve všech tkáních lidského těla. Základním ligandem všech podtypů těchto receptorů je adenosin. Ten se vyznačuje pleiotrofními efekty a nabízí tak vysoký terapeutický potenciál. Dokonalá znalost receptorové struktury stejně jako regulačních mechanismů, které receptor kontrolují během fyziologických i patologických stavů, je klíčová ve vývoji adenosinových léčiv.

Velkého pokroku ve studiu struktury adenosinových receptorů bylo dosaženo díky vytvoření krystalografického modelu  $A_{2A}$  receptoru s navázaným antagonistou ZM241385 (super-koфеin). Tento model pomohl objasnit či upřesnit předchozí vazebné a funkční studie. Nicméně vyvstalo mnoho nových otázek, které by měly být objasněny dalšími výzkumy. Je potřeba se zaměřit na otázky molekulárních mechanismů selektivity ligandů k jednotlivým receptorovým podtypům nebo například na konformační rozdíly receptorů při vazbě agonistů a antagonistů. Podrobnější průzkum je důležitý také v otázce dimerizace receptorů, především je nutné podrobnější objasnění struktury dimerizačních míst.

Během hypoxie dochází ke zvýšení koncentrace extracelulárního adenosinu. Následná aktivace adenosinových receptorů může mít různé cytoprotektivní účinky. Jednotlivé podtypy adenosinových receptorů mají unikátní výskyt a funkci, proto je v popředí zájmu vyvíjet co nejvíce selektivní ligandy a mířit tak přes daný receptor na konkrétní patologický stav bez vedlejších systémových účinků. Selektivní ligandy byly vytvořeny pro všechny čtyři adenosinové receptory. Rozsáhlejší znalosti pro tvorbu selektivních ligandů je potřeba získat zejména u  $A_{2B}$  receptoru, jehož fyziologická role není doposud dostatečně známá. Nejznámějším a komerčně nejvyužívanějším neselektivním ligandem adenosinových receptorů je kofein, který ovlivňuje nejen spánkový cyklus, ale vazbou na různé podtypy adenosinových receptorů je spojován s vlivem na změny nálad nebo zmenšení rizika vlivu Parkinsonovy choroby.

V neposlední řadě je důležitý výzkum abnormální funkce adenosinových receptorů. Jejich patologické stavy jsou spojovány s onemocněními jako Alzheimerova, Parkinsonova nebo Huntingtonova choroba. Mohou mít také vliv na psychické stavy člověka, například na pocit úzkosti, deprese, poruchy nálad. V poslední době je zájem o využití ligandů  $A_3$  receptorů jako protinádorových léčiv.

Adenosinové receptory zůstávají v popředí zájmu díky svým potenciálním terapeutickým možnostem. I přes poměrně vysokou znalost struktury a funkce jednotlivých receptorových podtypů je potřeba detailnější průzkum, který by využití receptorů a jejich ligandů přiblížil klinickému testování.

## Seznam použité literatury

- Alexander, S. P. H. and Millns, P. J. (2001) H-3 ZM241385 - an antagonist radioligand for adenosine A(2A) receptors in rat brain. *European Journal of Pharmacology* 411: 205-210.
- Baraldi, P. G., Iaconinoto, M. A., Moorman, A. R., Carrion, M. D., Cara, C. L., Preti, D., *et al.* (2007) Allosteric enhancers for A(1) adenosine receptor. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 7: 559-569.
- Canals, M., Burgueno, J., Marcellino, D., Cabello, N., Canela, E. I., Mallol, J., *et al.* (2004) Homodimerization of adenosine A(2A) receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of Neurochemistry* 88: 726-734.
- Chang, L. C. W., Brussee, J. and Ijzerman, A. P. (2004) Non-xanthine antagonists for the adenosine A(1) receptor. *Chemistry & Biodiversity* 1: 1591-1626.
- Ciruela, F., Escriche, M., Burgueno, J., Angulo, E., Casado, V., Soloviev, M. M., *et al.* (2001) Metabotropic glutamate 1 alpha and adenosine A1 receptors assemble into functionally interacting complexes. *Journal of Biological Chemistry* 276: 18345-18351.
- Clementina, M. and Giuseppe, S. (2010) A(2A) receptor ligands: past, present and future trends. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 10: 902-922.
- Cristalli, G., Lambertucci, C., Taffi, S., Vittori, S. and Volpini, R. (2003) Medicinal chemistry of adenosine A(2A) receptor agonists. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3: 387-401.
- Ferre, S., Fredholm, B. B., Morelli, M., Popoli, P. and Fuxe, K. (1997) Adenosine-dopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in Neurosciences* 20: 482-487.
- Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Ohana, G., Barer, F., Ochaion, A., Erlanger, A., *et al.* (2004) An agonist to the A(3) adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. *Oncogene* 23: 2465-2471.
- Fredholm, B. B., Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Daly, J. W., Harden, T. K., Jacobson, K. A., *et al.* (1994) Nomenclature and Classification of Purinoreceptors. *Pharmacological Reviews* 46: 143-156.
- Fredholm, B. B., Ijzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J. and Muller, C. E. (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors-An Update. *Pharmacological Reviews* 63: 1-34.
- Fuxe, K., Borroto-Escuela, D. O., Marcellino, D., Romero-Fernandez, W., Frankowska, M., Guidolin, D., *et al.* (2012) GPCR Heteromers and their Allosteric Receptor-Receptor Interactions. *Current Medicinal Chemistry* 19: 356-363.

- Gao, Z., Ni, Y., Szabo, G. and Linden, J. (1999) Palmitoylation of the recombinant human A(1) adenosine receptor: enhanced proteolysis of palmitoylation-deficient mutant receptors. *Biochemical Journal* 342: 387-395.
- Gao, Z. G., Van Muijlwijk-Koezen, J. E., Chen, A., Muller, C. E., Ijzerman, A. P. and Jacobson, K. A. (2001) Allosteric modulation of A(3) adenosine receptors by a series of 3-(2-pyridinyl)isoquinoline derivatives. *Molecular Pharmacology* 60: 1057-1063.
- Giorgi, I., Biagi, G., Bianucci, A. M., Borghini, A., Livi, O., Leonardi, M., *et al.* (2008) N6-1,3-diphenylurea derivatives of 2-phenyl-9-benzyladenines and 8-azaadenines: synthesis and biological evaluation as allosteric modulators of A(2A) adenosine receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry* 43: 1639-1647.
- Göblyös, A. and Ijzerman, A. P. (2011) Allosteric modulation of adenosine receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808: 1309-1318.
- Hernan, M. A., Takkouche, B., Caamano-Isorna, F. and Gestal-Otero, J. J. (2002) A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 52: 276-284.
- Hutchinson, S. A. and Scammells, P. J. (2004) A(1) adenosine receptor agonists: Medicinal chemistry and therapeutic potential. *Current Pharmaceutical Design* 10: 2021-2039.
- Jaakola, V. P., Griffith, M. T., Hanson, M. A., Cherezov, V., Chien, E. Y., Lane, J. R., *et al.* (2008) The 2.6 angstrom crystal structure of a human A(2A) adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322: 1211-1217.
- Jacobson, K. A., Klutz, A. M., Tosh, D. K., Ivanov, A. A., Preti, D. and Baraldi, P. G. (2009) Medicinal chemistry of the A(3) adenosine receptor: agonists, antagonists, and receptor engineering. *Handbook of Experimental Pharmacology*: 123-159.
- Jiang, Q., Lee, B. X., Glashofer, M., van Rhee, A. M. and Jacobson, K. A. (1997) Mutagenesis reveals structure-activity parallels between human A(2A) adenosine receptors and biogenic amine G protein-coupled receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 40: 2588-2595.
- Keuerleber, S., Gsandtner, I. and Freissmuth, M. (2011) From cradle to twilight: The carboxyl terminus directs the fate of the A2A-adenosine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808: 1350-1357.
- Kiesman, W. F., Elzein, E. and Zablocki, J. (2009) A(1) adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. *Handbook of Experimental Pharmacology*: 25-58.
- Klaasse, E. C., Ijzerman, A. P., de Grip, W. J. and Beukers, M. W. (2008) Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signalling* 4: 21-37.
- Klinger, M., Freissmuth, M. and Nanoff, C. (2002) Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cellular Signalling* 14: 99-108.

- Klotz, K. N. (2000) Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 382-391.
- Mantell, S. J., Stephenson, P. T., Monaghan, S. M., Maw, G. N., Trevethick, M. A., Yeadon, M., *et al.* (2009) SAR of a series of inhaled A(2A) agonists and comparison of inhaled pharmacokinetics in a preclinical model with clinical pharmacokinetic data. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 4471-4475.
- McNeely, P. M., Naranjo, A. N. and Robinson, A. S. (2012) Structure-function studies with G protein-coupled receptors as a paradigm for improving drug discovery and development of therapeutics. *Biotechnology Journal* 7: 1451-1461.
- Muller, C. E. and Jacobson, K. A. (2011) Xanthines as adenosine receptor antagonists. *Handbook of Experimental Pharmacology*: 151-199.
- Muller, C. E. and Stein, B. (1996) Adenosine receptor antagonists: Structures and potential therapeutic applications. *Current Pharmaceutical Design* 2: 501-530.
- Müller, C. E. and Jacobson, K. A. (2011) Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808: 1290-1308.
- Peeters, M. C., Wisse, L. E., Dinaj, A., Vroiling, B., Vriend, G. and Ijzerman, A. P. (2012) The role of the second and third extracellular loops of the adenosine A(1) receptor in activation and allosteric modulation. *Biochemical Pharmacology* 84: 76-87.
- Piirainen, H., Ashok, Y., Nanekar, R. T. and Jaakola, V.-P. (2011) Structural features of adenosine receptors: From crystal to function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808: 1233-1244.
- Polosa, R. and Blackburn, M. R. (2009) Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 528-535.
- Rezey, J. V., Adam, M., Khatami, R., Luhmann, U. F. O., Jung, H. H., Berger, W., *et al.* (2007) A genetic variation in the adenosine A(2A) receptor gene (ADORA2A) contributes to individual sensitivity to caffeine effects on sleep. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 81: 692-698.
- Rovati, G. E., Capra, V. and Neubig, R. R. (2007) The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: Beyond the ground state. *Molecular Pharmacology* 71: 959-964.
- Schenone, S., Brullo, C., Musumeci, F., Bruno, O. and Botta, M. (2010) A(1) receptors ligands: past, present and future trends. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 10: 878-901.
- Shneyvays, V., Mamedova, L., Zinman, T., Jacobson, K. and Shainberg, A. (2001) Activation of A(3) adenosine receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33: 1249-1261.

- Thimm, D., Schiedel, A. C., Sherbiny, F. F., Hinz, S., Hochheiser, K., Bertarelli, D. C. G., *et al.* (2013) Ligand-Specific Binding and Activation of the Human Adenosine A(2B) Receptor. *Biochemistry* 52: 726-740.
- Trincavelli, M. L., Daniele, S. and Martini, C. (2010) Adenosine Receptors: What We Know and What We are Learning. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 10: 860-877.
- van Muijlwijk-Koezen, J. E., Timmerman, H., Link, R., van der Goot, H. and AP, I. J. (1998) A novel class of adenosine A(3) receptor ligands. 1. 3-(2-Pyridinyl)isoquinoline derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 41: 3987-3993.
- Wei, C. J., Li, W. and Chen, J. F. (2011) Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1808: 1358-1379.